

## További sugárzaskémiai vizsgálatok ATP-vel vizes oldatban

GARAY KÁROLY és G. FEHÉR IBOLYA

*Agrokémiai Kutató Intézet Biokémiai Osztálya, Budapest*

Előző dolgozatunkból (23) kitűnik, hogy a különböző sugárzások az adenozin-trifoszfátra (ATP-re) vizes oldatban úgy hatottak, hogy a feltételek bizonyos megváltoztatásával egyszer az ATP molekula magasenergiájú foszfáteszter kötéseinek enzimhasíthatósága fokozódott (S-ATP), máskor pedig kifejezetten csökkent (R-ATP) a kontrol ATP-hez képest. Tudjuk, hogy az ATP döntően fontos szerepet visz az életfolyamatokban. Az ATP-ből való energiafelszabadítás sebességének nagysága alapvetően befolyásolja a biológiai folyamatok alakulását. Ezért nagyon fontos megállapítani azt a sugárzaskémiai hatásmechanizmust, amely az ATP fokozott, illetve csökkent hasíthatóságát kísérleti feltételeink között előidézi. Ennek kiderítésével valószínűleg betekintést nyerhetünk abba a mechanizmusba, amelyben az ATP fiziológiai körülmények között fokozottan, illetve csökkentebben válik hasíthatóvá. Előző vizsgálataink folytatásának célja, hogy további betekintést kapjunk az ATP sugárzaskémiai átalakulásának mechanizmusába, valamint az enzim + szubsztrátum viszonyba. Ezen cél érdekében végzett vizsgálataink a különböző kísérleti tényezők hatását igyekeztek kideríteni, nevezetesen, hogy hogyan alakul az ATP hasíthatósága az idő és az ATP koncentrációja függvényében.

### Kísérleti módszerek

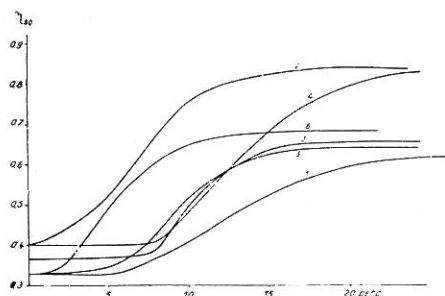
Jelen kísérleteinknél az előző dolgozatban közölt módszereket alkalmaztuk (23).

A különbözőképpen kezelt ATP strukturális viszonyainak vizsgálatához — a később részletesen kifejtett okból — szükség volt arra, hogy az ATP hasítási reakcióját különböző stádiumban megállítsuk. Ezt úgy végeztük, hogy 1,5 ml B-miozinhoz 1 ml ATP oldatot (50  $\gamma$ /ml) adtunk, melyet — ha nagyobb koncentrációjú ATP volt a vizsgálat tárgya — közvetlen a hasítási vizsgálat, illetve az UV abszorpciós spektrogramok felvétele előtt egy-két perccel készítettünk. Ha az enzimhasítást le akartuk állítani, ilyen összetételű enzim + szubsztrátum oldat 3 ml-hez kétszer üvegből desztillált vízben átkristályosított és foszforpentoxid felett szárított pro anal. ammonszulfát egy grammját adtuk. A hasítás leállításáig előbbi összetételű enzim + szubsztrátum oldatkeverék 0 °C-on jeges vízben üvegpohárban fényen állt. A só hozzáadása után üvegbottal rögtön erőlyesen kevertük, mialatt a B-miozin nagy pelyhekben kicsapódott. Az ATP hozzáadása és a csapadék szűrése között soha sem telt el 90 másodpercnél hosszabb idő. A csapadékot S & S 575 számú szűrőpapírral szűrtük. A  $K_0$ ,  $S_0$ ,  $R_0$  jelzések az UV abszorpciós spektrogramokban azt jelentik, hogy itt az enzim az ATP-vel másodpercekgig állt együtt, de 90 másodpercnél hosszabb ideig sohasem. A szüredékről rögtön Beckmann spektrofotométer DU modelljén közepes fényérzékenység, 0,5 mm résztávolság és 1 cm kvarcküvetta használatával UV spektrogramot vettünk fel.

A spektrogramok felvétele alatt a Straub-féle viszkoziméteres módszerrel vizsgáltuk az enzimhasítást. A többi jelzés, pl.  $K_{15}$ ,  $K_{40}$ ,  $K_{60}$ , s ugyanígy az S és R-ATP-k jelzésénél is azt jelentik, hogy itt az ATP az enzimmel jeges vízben fényen 15, 40, 60 percig állt együtt és ezután a fent leírt módon szobahőmérsékleten ugyancsak spektrogramot vettünk fel. A szüredékben szervesen változik a foszfort, illetve ammóniát is meghatároztunk az előbb leírt módon (23).

### Kísérleti eredmények és azok megbeszélése

Az 1. ábrán bemutatott enzimhasítási görbék és az ennek megfelelő, de itt nem közölt UV abszorpciós spektrogramok azt mutatják, hogy mind a sugárzás alatt, mind a sugárzás abbahagyása után az ATP molekula hasíthatósága, illetve abszorpciós spektrogramja lényegesen változik. Ezek az eredmények US sugárzásra vonatkoznak, azonban ugyanez érvényes az UV és röntgen besugárzásra is. Ennek



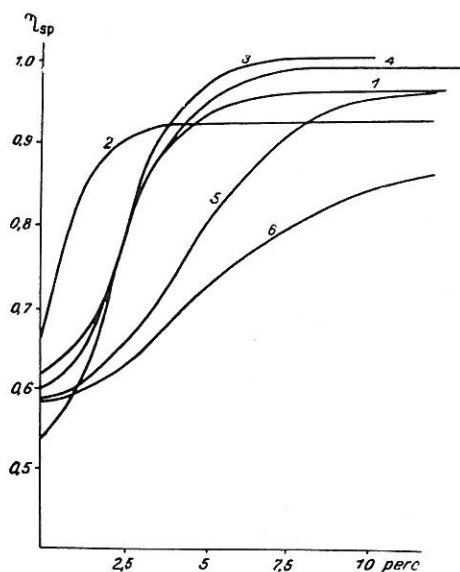
1. ábra.

ATP hasíthatóság változása az US sugárzás ideje alatt 50  $\gamma$ /ml ATP+US (levegőn). 1 Kontrol ATP. 2: 10 perc US—ATP. 3: 20 perc US—ATP. 4: 40 perc US—ATP. 5: 80 perc US—ATP. 6: 100 perc US—ATP.

megfelelően az enzimhasítással egyidőben felvett UV abszorpciós spektrogramok egyértelműen az előző közleményben (23) már megállapított szabályszerű összefüggést mutatják: a fokozott enzimhasítással csökkent, a gátolt hasítással pedig megnövekedett extinkció jár együtt. Látjuk, hogy a hasíthatóság nagymértékben emelkedik egészen kis sugárzási energia hatására, majd tovább folytatva a besugárzást, ugyanilyen intenzitással, a hasíthatóság egy idő után ismét csökken, majd megint emelkedik és így tovább fluktuál hosszú ideig. Ez a fluktuálás csökkenő amplitudójú és a hasíthatóság mértéke egy egyensúlyi érték felé látszik közeledni. (Hangsúlyozni szeretnénk, hogy amint a hasíthatóság változik, ugyanúgy változik az UV abszorpciós görbe extinkciója is.) Ugyanezt tapasztaljuk akkor is, ha a besugárzást abbahagyjuk és utána bizonyos időközökben a hasíthatóságot figyeljük. Tudjuk, hogy a legtöbb rendszer egyensúly felé törekvését statisztikus fluktuáció jellemzi, melyben az egyes molekulák, illetve ezek kis csoportja a potenciális energia-minimumból átmennek gerjesztett állapotba, majd ezt elhagyva, ismét a minimum felé tartanak. Az enzimhasíthatóságnak fentjelzett időbeli változása szabad radikális mechanizmusra, illetve ezek meghatározta láncfolyamatra utal. A láncfolyamatokban a kezdeti lépés igen nagy aktiválási energiával jár. A mi rendszerünkben a víz fotolízises hasításához szükséges aktiválási energiát az alkalmazott sugárzások kvantumai bőven fedezik. Idevonatkozó reakciókinetikai vizsgálataink folyamatban vannak. A sugárzások abbahagyása utáni, ú. n. »sugárzásutáni hatást« — különösen a röntgensugárzás nukleinsavakra való hatás-vizsgálatánál legutóbb — mások is kimutatták (24, 41, 65, 66).

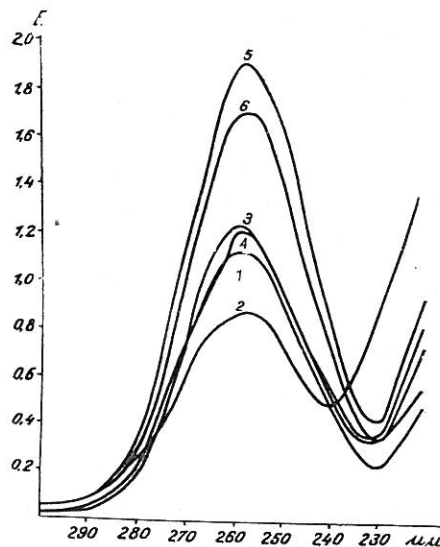
A 2. ábra a sugárhatás eredményét mutatja a besugárzott ATP koncentrációjának függvényében. Azt találtuk, hogy a háromfajta sugárzásnak kitett különböző koncentrációjú ATP oldat enzimhasíthatósága változása és az ennek megfelelő UV abszorpciós tulajdonságváltozása közötti előbbi összefüggés itt is fennáll.

Kísérleteinkből megállapítható, hogy a növekvő koncentráció irányában ugyanolyan enzim hasíthatóság eléréséhez hosszabb besugárzási idő kell. Az ábrán az ultraszonikus sugárzás hatását látjuk 500  $\gamma$ /ml ATP oldatra. Az egyidőben sugárzott 50  $\gamma$ /ml ATP oldat már majdnem maximális hasíthatóság fokozódást mutat, amikor az 500  $\gamma$ /ml oldaton sem az enzim hasíthatóságban, sem ennek megfelelően az abszorpciós spektrogramban semmi sugárhatást nem észlelünk.



2 a. ábra.

ATP hasíthatóságának változása US sugárzás hatására (1 óráig tartó sugárzás).



2 b. ábra.

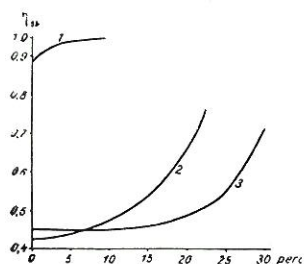
US sugárzás hatása az ATP abszorpciós spektrumára.

- 1: 50  $\gamma$ /ml: kontrol ATP 24 órai állás. 2: 50  $\gamma$ /ml US—S-ATP 0 percben. 3: 500  $\gamma$ /ml US—S-ATP 0 percben. 4: 50  $\gamma$ /ml kontrol ATP 0 percben. 5: 500  $\gamma$ /ml kontrol ATP 24 órai állás. 6: 5000  $\gamma$ /ml kontrol ATP 24 órai állás.

UV-vel sugározva 50  $\gamma$ /ml ATP oldat hasíthatóságfokozódása a 30—40 percnél kezdődött; ugyanilyen körülmények között vele egyidőben sugárzott, ugyanabból az ATP törzsoldatból készített 500  $\gamma$ /ml ATP oldat a besugárzás után 3,5—4 óra múlva, 10 mg/ml ATP oldat hasíthatóságfokozódása pedig 5—7 óra múlva kezdődött. Ezek 10—10, ugyanabból az ATP törzsoldatból készített oldatokon nyert sugárzásos vizsgálatok átlagos értékei. Az ilyen nagyobb koncentrációjú ATP oldatokban is észlelhető az ú. n. »sugárzás utáni hatás«. A koncentráció függvényére vonatkozó vizsgálataink folyamatban vannak és érdekes lesz összehasonlítani ezeket a vizsgálati eredményeinket Alder és Eyring (1, 21) eredményeivel, illetve erre vonatkozó elméletükkel.

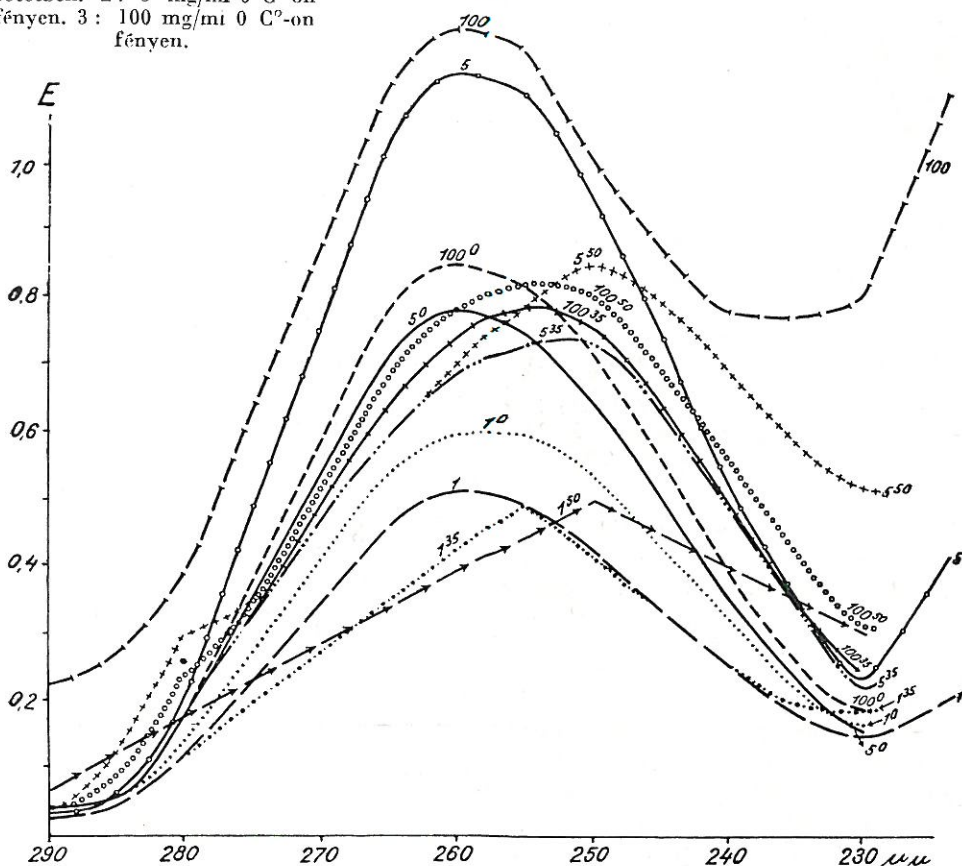
További kísérleteinkkel azt akartuk eldönteni, hogy 1. az S-, R-, illetve a kontrol ATP UV, abszorpciós spektrogramjai hogyan alakulnak az enzim különböző ideig tartó ráhatása után. Ézzel arra akartunk választ kapni, hogy ezen spektrogramoknak az enzimráhatás utáni változása azonos tendenciájúak-e és hogy a változás mértéke egyenlő-e, vagy különböző. Továbbá 2. arra nézve is kiterjesztettük vizsgálatainkat, hogy az enzim hasíthatóság változásának különböző

módon való előidézése ugyanolyan összefüggésre vezet-e a hasíthatóságváltozás és a spektrumváltozás között, mint amilyent eddig tapasztaltunk. Ezekkel a kísérletekkel még jobb betekintést kívántunk nyerni a hasíthatóságváltozással kapcsolatos szerkezeti változások mibenlétébe. 3. Tájékozódást szerettünk volna nyerni arra, hogy az ATP molekula UV, abszorpciós spektrogramjának kialakításában a főszerepet vajjon a purinváz, vagy pedig a purinváz + oldallánc-, és itt különösen a pirofoszfátlánc — játsza-e? A probléma megközelítésének ezt a módját továbbvive, itt is bevezettük, hogy az enzimkezelt ATP-reziduumok hogyan viselkednek fényen, sötétben és különböző hőmérsékleteken. Idevonatkozó nagyszámú kísérleteink eredményét a csatolt 3—6. ábrákban szeretnők bemutatni, amelyek jellegzetesen képviselik e nagyszámú kísérletek közös vonásait.



3 a. ábra.

Különböző koncentrációban és hőfokon állt ATP enzimhasítási görbéi. 1: 1 mg/ml 36 C°-on sötétben. 2: 5 mg/ml 0 C°-on fényen. 3: 100 mg/ml 0 C°-on fényen.

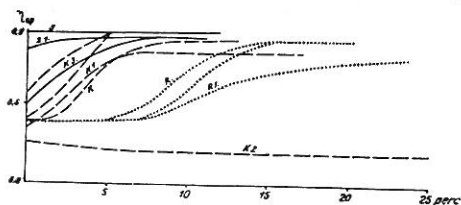


3 b. ábra.

Különböző koncentrációban és hőfokon állt ATP UV abszorpciós görbéi. 1: 1 mg/ml 36 C°-on sötétben. 5: 5 mg/ml 0 C° fényen. 100: 100 mg/ml 0 C° fényen. A nulla felső indexszámok maximálisan 90 másodpercig; 35—50 felső indexszámok 35—50 percig enzimkezelt ATP-k.



A 3a. ábrán látjuk, hogy az 1 mg/ml 36 C°-on tartott ATP oldatból készült 50  $\gamma$ /ml ATP hasíthatósága és ennek megfelelően extinkciója lényegesen eltér a 0 C° fényen álló 5 mg/ml és 100 mg/ml-ből készített 50  $\gamma$ /ml hasíthatóságától,



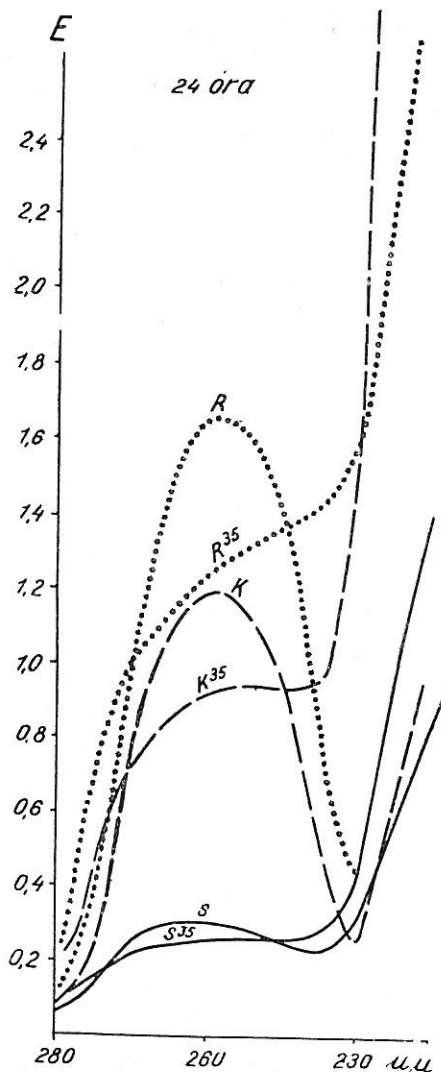
4 a. ábra.

ATP (50  $\gamma$ /ml) hasíthatóságának változása UV sugárzás hatására a besugárzás utáni különböző időpontokban 0 C°-on. K: Kontrol ATP 0 percben. K1: Kontrol ATP 24 órás állás fényen. S: UV ATP 0 percben. S1: UV ATP 24 órás állás fényben. R: R-ATP 0 percben. R1: R-ATP 24 órás állás fényben. K2: 96 órás állás fényen. K3: 96 órás állás sötétben.

illetve extinkciójától. Tehát itt is látjuk a hasíthatóság és az extinkció között a szabályszerű összefüggést. Ezt látjuk a 4., 5., 6. ábrákon. Ezekben a kísérletekben UV-vel sugároztunk, de az itt nem közölt kísérleteink szerint ugyanez vonatkozik, a röntgen és ultraszonikus sugárzásra is. A 4. ábra azt mutatja (ami a legtöbb esetben az S-ATP preparálásánál adódott), hogy az oldat sugárzásakor fokozott hasíthatóság (S-ATP), az oldószer sugárzásakor (R-ATP) lassított hasíthatóság lépett fel. Az 5. ábrán egy kivételes esetet mutatunk (mely kísérleteinkben igen ritkán fordult elő), nevezetesen, hogy itt az R-ATP hasíthatósága fokozott. A 6. ábrán az R-ATP hasíthatósága — mint látjuk — alig tér el a kontrol ATP hasíthatóságától. A 3—6. ábrákon továbbá látjuk a 90 másodpercig és hosszabb ideig tartó enzimes ráhatás után kapott ATP-reziduumspektrogramjait. Ezekben az ATP reziduumban az enzimhatás következtében az ATP két terminális foszfátja, valamint az adenin vázban lévő amidó gyök biztosan hiányzik.

A 3—6. ábrákhoz csatolt minden egyes UV abszorpciós spektrogramban az alábbi közös jellegzetességeket vehetjük észre.

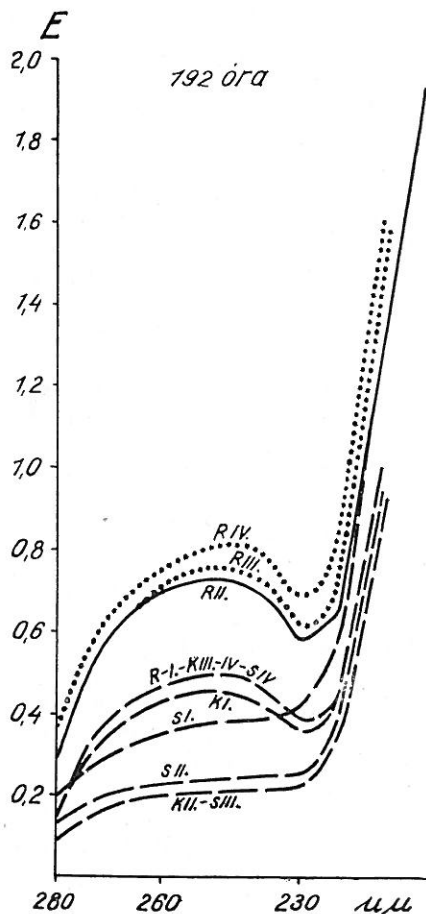
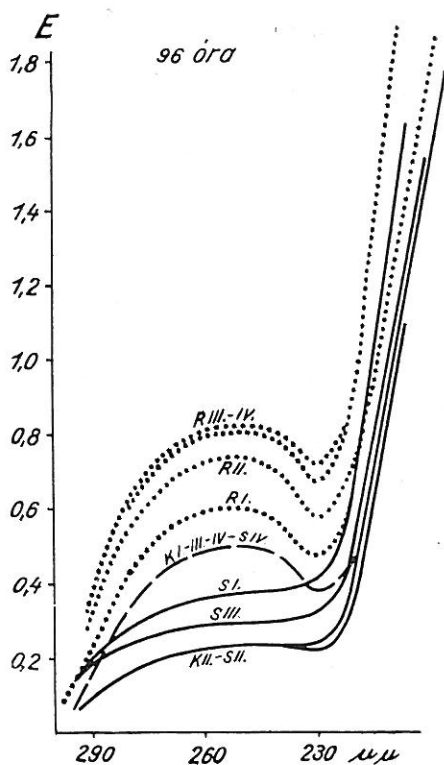
1. Itt is megvan a hasíthatóság és az extinkció között észlelt általános szabályszerű összefüggés: fokozott hasíthatóságú ATP-nek a kontrolhoz képest csökken-



4 b. ábra.

ATP-nek UV abszorpciós görbéi az UV sugárzás hatására a besugárzás után 24 óra múlva. A felső indexszám 35 perces enzimhatás után.

tebb extinkció felel meg, míg a lassított hasíthatóságú ATP-nek a kontrollhoz képest nagyobb extinkció. Ezzel kapcsolatban szeretnénk hangsúlyozni, hogy az eddig végzett nagyszámú kísérleteinkben fontos azt megállapítani, hogy bármilyen módon is állítottuk elő a fokozott hasíthatóságú, illetve lassított hasíthatóságú ATP-molekulát: a hasíthatóság fokozódáshoz minden esetben kisebb extinkció, a lassított hasíthatósághoz pedig fokozott extinkció járul. Eppen ezért közöltük az 5. ábrát, ahol az R-ATP mutatott hasíthatóság-növekedést. Szabályszerűen az abszorpciós spektrogramban ennek megfelelően csökkent itt is az extinkció

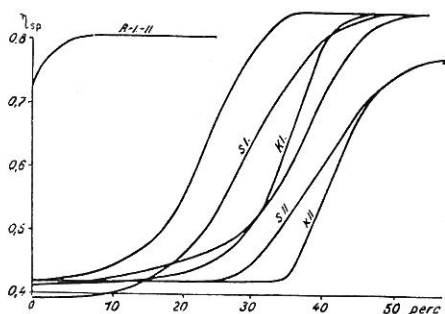


4. c és d ábra.

ATP UV spektruma az enzimbehatás után különböző időpontokban. I: 0 C° fény. II: 0 C° sötét. III: 40 C° fény. 4: 40 C° sötét. Az enzimbehatás után 96, illetőleg 192 órai állás után.

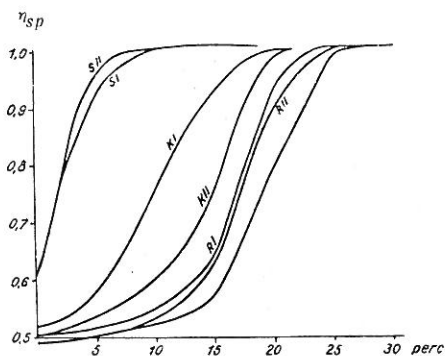
a kontrol ATP-hez képest. Ugyanezeket a viszonyokat találtuk a röntgen, illetve az ultraszonikus sugárzásos kísérleteinkben is. Eddig végzett nagyszámú idevonatkozó kísérleteink alapján határozottan állíthatjuk, hogy a hasíthatóság és az extinkció változása között ez az általános szabályszerű összefüggés mindig ilyen volt. Nem találtunk olyan esetet, ahol a lassított hasíthatósághoz a kontrollhoz képest csökkentebb extinkció járult volna. Ha bármilyen oknál fogva ez a hasíthatóság változott, akkor az előbbi szabályszerű összefüggés értelmében ugyanúgy változott az extinkció is.

2. Az UV abszorpciós spektrogramokban további jellegzetes változást akkor észleltük, amikor a különböző ATP-k (S-, R-, kontrol) az ATP-áz enzimmel különböző ideig álltak együtt. A legfeltűnőbb változás akkor keletkezett, amikor az enzim a szubsztrátummal másodpercekig (de 90 másodpercnél tovább soha nem) állt. Az S-, R- és kontrol ATP-nél a másodpercekig tartó enzimhatásra az extinkció maximuma eltolódás nélkül először minden esetben csökkent. Néhány esetben,



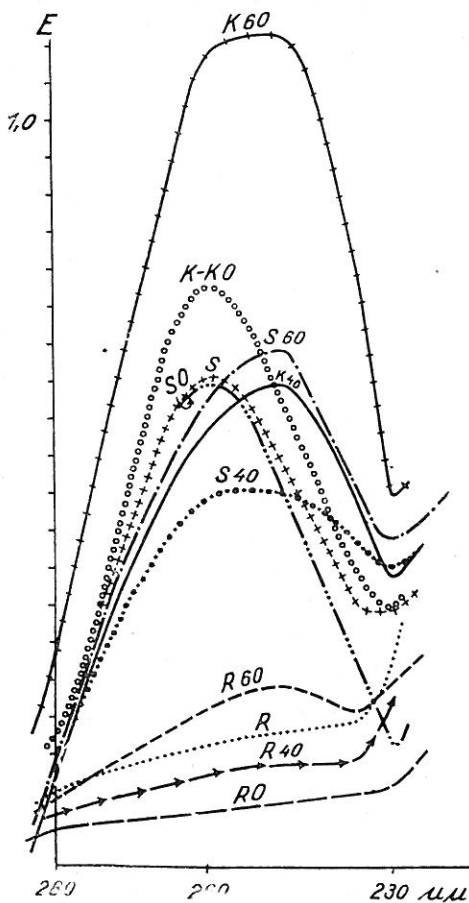
5 a. ábra.

ATP hasíthatóságának változása UV besugárzásra 0 C°-on 150 γ/ml ATP oldatban. KI: Kontrol ATP 0 percen. KII: Kontrol ATP 48 órai állás fényben. SI: S—ATP 0 percen. SII: S—ATP 48 órai állás fényben. RI: R—ATP 0 percen. RII: R—ATP 48 órai állás fényben.



6 a. ábra.

ATP hasíthatóságának változása UV besugárzásra 100 γ/ml oldatban. Jelzések: I = 0 perc. II = 24 órai állás után.

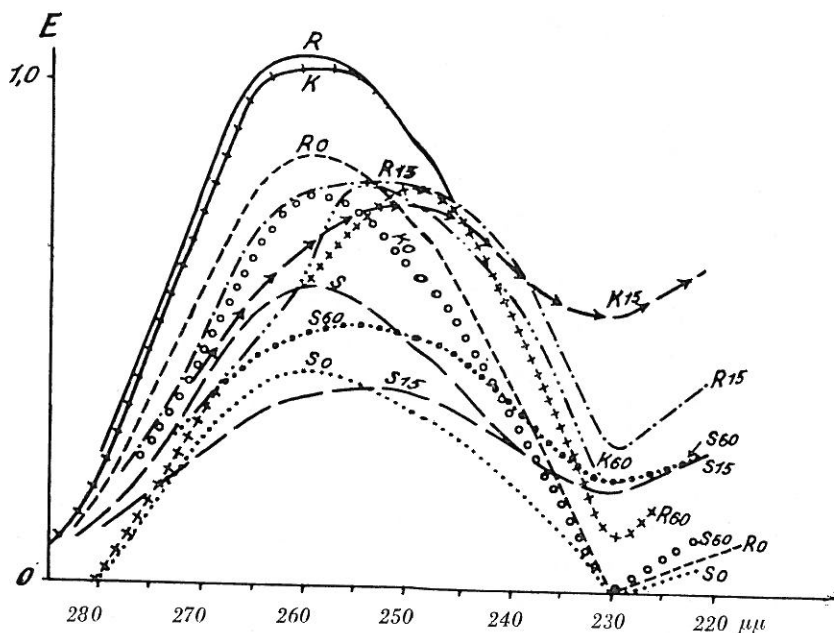


5 b. ábra.

K—S—R—ATP-k spektrogramjai különböző ideig tartó enzimráthatás után. K, S, R, enzimhatás nélkül; K<sub>0</sub>, S<sub>0</sub>, R<sub>0</sub>, max. 90 másodperc után K<sub>40</sub>, S<sub>40</sub>, R<sub>40</sub>, 40 perc után. K<sub>60</sub>, S<sub>60</sub>, R<sub>60</sub>, 60 perc enzimráthatás után.

de csak az S-ATP-nél, tapasztaltuk, hogy 90 másodpercig tartó preparálás után rögtön felvett abszorpciós spektrogram a kiindulási értékhez képest nem csökkent, hanem kissé emelkedett. Ha ilyen esetekben a 90 másodperces preparálását meg rövidítettük, akkor azt tapasztaltuk, hogy a kapott spektrogram extinkciója valóban csökkentett volt a kiindulási értékhez képest. Ezt látjuk a 3. ábrán az 1 mg/ml-ből készített 50 γ/ml preparálásánál.

Valószínűen arról van szó, hogy a fokozottan hasíthatóvá tett ATP-nél az enzim az ATP molekulában ugyanannyi idő alatt nemcsak egyfajta változást hozott létre, vagyis azt a konfigurációbeli változást, amelyet mi a Beckman spektrofotométerben mint extinkciócsökkenést látunk, hanem ezt a változást rövidebb idő alatt tudván elvégezni, ezután már másfajta struktúrabeli változást kezd létrehozni: azt, amely az extinkció növekedést okozza. Valóban ezt többször tapasztaltuk. Természetesen azt is tapasztaltuk, hogy a 90 másodpercig való ráhatás nem elégséges annak a konfigurációbeli változásnak a létrehozására, amely az extinkciócsökkenésben nyilvánul, hanem ennél hosszabb idő szükséges. Azt még



6 b. ábra.

UV abszorpciós spektrogramok különböző ideig tartó enzimráhatás után K-, R-, S-, enzimráhatás nélkül. 15 és 60 percig tartó enzimráhatás után.

pontosan nem tudjuk megállapítani, hogy milyen az összefüggés a különböző ideig tartó enzimráhatás és az okozott optikai tulajdonságváltozás között. Ugyancsak nem ismeretes, hogy itt milyen a hatásmechanizmus, továbbá, hogy milyen tényezők határozzák meg azt, hogy egy bizonyos extinkciós együtthatóval rendelkező ATP-nél milyen enzimráhatás, hogy változtatja extinkcióját, míg elkezdődik a foszforlehasítás. Mi abban a jelenségben, hogy a szubsztrátummal való érintkezés pillanatától kezdve egy bizonyos ideig az ATP molekula extinkció-csökkenéssel járó konfigurációváltozáson megy át, alkalmas módszert látunk arra, hogy megközelítsük azt a mechanizmust, amely létrehozza az enzim-szubsztrát komplex képződésénél a tranzíciós állapotot. Továbbiakban azt találtuk, hogy ez az extinkciócsökkenés a maximum helyének változása nélkül elér egy alsó, legkisebb értéket és innen kezd a maximum a kisebb hullámhosszak felé tolni. Más esetekben a lecsökkent legkisebb extinkciós érték újból az abszorpciós maximum helyének változása nélkül emelkedik egy bizonyos ideig, túl is haladván az eredeti kiindulási

extinkciós értéket és ezután kezd a rövidebb hullámok felé tolódni. Itt éppen az a jelentős, hogy az alatt az idő alatt, amíg az abszorpciós maximum helye ezen extinkcióváltozás (csökkenés, majd emelkedés) ideje alatt nem változik: a szüredékben lehasított szervesetlen foszfort nem tudtunk kimutatni. Ez csak akkor volt kimutatható, amikor az UV abszorpciós spektrogramban az abszorpciós maximum helye a rövidebb hullámok felé kezdett tolódni (hipszokrom hatás).

Az a két időtartam, amely az enzimráthatás kezdetétől a hipszokrom hatás fellépéséig terjed, továbbá az az időtartam, amely az enzimhasításban a viszkoziméteres görbében megállapított alsó, vízszintes szár emelkedésének kezdetéig tart, eddigi kísérleteink alatt és kísérleti feltételeink között nagyjából megegyezett. Azt gondoljuk, hogy a nagyobb feloldóképességű és a finom struktúra megfigyelését lehetővé tevő fotografikus spektrográffal, valamint más idevonatkozó fizikokémiai módszerekkel: paragmáneses szuszceptibilitás, infravörös és Raman spektrogram, molpolarizáció, optikai forgatóképesség, dipolmomentum stb. meghatározásaival exakt adatokat tudunk szerezni a probléma megközelítésére. Azt gondoljuk, hogy itt az ATP aktiválási időtartama az az idő, mely eltelik az enzimráthatás kezdetétől extinkció értékének lecsökkenéséig a legkisebb értékig, majd innen ugyancsak az abszorpció maximum hullámhosszán egy bizonyos maximális értékig való felemelkedéséig, amely után elkezdődik a hipszochrom eltolódás: ez az időtartam szükséges az enzimnek az ATP molekula aktiválására. Mint említettük, eddigi kísérleteinkben ez alatt az idő alatt szervesetlen foszfort a szüredékben nem találtunk. A sugárzás, valamint az ATP-áz hatására a hipszokrom eltolódás pillanatáig bekövetkező extinkcióváltozást azért tartjuk jelentősnek, mert az extinkcióváltozás lefolyása mindkét esetben hasonló tendenciájú és így a sugárzás hatásmechanizmusának könnyebb kiderítése révén támpontokat nyerhetünk az enzim + szubsztrát reakcióra nézve. Ebből arra szabad következtetnünk, hogy ezen jelenség létrehozásában az enzimráthatás és az ATP oldat sugárzása (a sugárzó energia beépítése az ATP molekulába) azonos konfigurációbeli, energetikai változást hoznak létre az ATP molekulában, melynek következménye az azonos optikai viselkedésmód. Ha ez a felfogásunk helyes, akkor megokolt az a következtetésünk, hogy ha megismerjük a sugárzás okozta ATP konfigurációbeli változásokat, illetve pontosabban, ha megismerjük a sugárzó energia beépülésének mechanizmusát az ATP molekulába, akkor ezzel valószínűen azt is megismerjük, hogy mi történik az aktiválás alatt az ATP-vel az enzimráthatás ideje alatt.

3. A 3—6. ábrákon látható UV abszorpciós spektrogramok harmadik jellegzetessége az, hogy az enzim pár másodperces ráthatása alatt létrejött extinkciócsökkenés annál kisebb, minél kisebb volt az eredeti extinkciós érték. Ez véleményünk szerint fontos, mert élesen rávilágít a szubsztrátumra való enzimhatás egyik mozzanatára. Nevezetesen arra, hogy kifejezett konfigurációbeli (geometriai) változásokat hoz létre az enzim az ATP molekulán, hogy hozzáférhessen az aktív reakciós centrumhoz, hogy létrehozza az enzimfelület és szubsztrátum megfelelő részeinek helyes orientációját, hogy kifejlessze az egymással kapcsolódó atomok belső mozgása koordinált fázisait, vagyis, hogy beépíthesse az ATP molekulába a magasenergiájú foszfáteszterkötés széthasításához feltétlenül szükséges aktiválási energiát. Tehát tulajdonképpen ezek az UV abszorpciós spektrogramok jellegzetesen mutatják az aktiválás szabad energiája és az aktiválás entropiája konpenzatorikus összefüggését: nagy aktiválási energiához nagy entropia faktor (PZ) járul, kis aktiválási energia pedig alacsony entropia faktort igényel. (Legújabban T a f t és mások a reaktivitás és a molekulaszervezet bizonyos szubsztituensek révén való megváltoztatása közötti összefüggést vizsgálva, az aktiválás szabad



energiája, a szubsztituensek szterikus faktora, valamint poláris hatása közt mennyiségi összefüggést találtak (59).)

4. Ezeken az ábrákon látható negyedik jellegzetesség az extinkció maximumának rövidebb hullámok felé való eltolódása (hipszokromia), valamint hiperkromiája. Ez utóbbi annál nagyobb, minél nagyobb volt az eredeti kiindulási ATP extinkciója.

A 4. ábrát kissé részletesebben tárgyaljuk. Itt az UV kezelt S-, R-ATP-enzimes görbéit látjuk a kontrol ATP-hez viszonyítva a 0 percben és 24 órai állás után felvéve. A megfelelő spektrogramok felvétele csak 24 óra múlva volt lehetséges (4. b ábra). A 4. b ábrán a 35 perces enzimráhatás után az abszorpciós spektrogramok változását látjuk. A 4. c és 4. d ábrákon mutatjuk a 35 perces enzimráhatás utáni ATP reziduum (AP, illetve inozin) spektrogramjainak az alakulását 0 és 40 C°-on fényen és sötétben, 96, illetve 192 órai állás után. Ilyen típusú kísérletekből eddig 11-et végeztünk (4 UV-vel, 4 rtg-el és 3 ultraszonikusan sugározva) különböző kísérleti körülmények között. Mint láthatjuk a különböző ideig való enzimráhatás és különböző ideig való hőmérsékleteken, illetve fényen-sötétben való állás után hasonló tendenciájú viselkedést mutat. Bár a kísérletek még folyamatban vannak, ezek alapján a következőket állapíthatjuk meg:

a) A viszkoziméteres enzimhasítási tesztben a görbe felső vízszintes szára elérésének enzimráhatás után kapott ATP reziduum spektrogramja a kontrol, az S-, illetve R-ATP-knél úgy alakul, hogy az extinkciós értékek csökkenése annál nagyobb, minél nagyobb az eredeti kiindulási ATP (kontrol-, S-, illetve R-ATP) extinkciója ( $K_I$ ,  $S_I$ ,  $R_I$ -esre vonatkoztatva). Az S-ATP-nél ez a változás a legkisebb, szinte elhanyagolható. Ez lényeges hatás.

b) Kitűnik, hogy az S-, R-ATP reziduumok fényre, sötétre ellentétesen reagálnak. Ez is mutatja a szerkezetek különbözőségét.

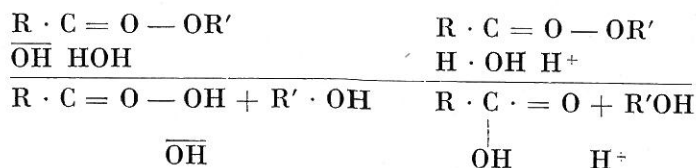
c) Ezeknél az ATP reziduumoknál a fény-sötét hatás lényegesen kisebb, mint az érintetlen kontrol, S- és R-ATP molekuláknál és a magasabb hőmérsékleten ez a fény-sötét hatás egy közös érték felé való törekvést mutat.

### Fejtegetések

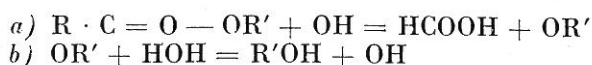
Kísérleti eredményeink az alábbi kérdéseket vetik fel.

1. Az enzimhasítás fluktuálása, illetve reverzibilitása.
2. Az enzimhasítás mechanizmusának sugárzásokozta megváltozása.
3. A fokozott, illetve csökkent hasíthatóságú ATP (S-, R-ATP) keletkezésének mechanizmusa.

Az eszterhidrolízis általános egyenlete  $\text{RCOOR}' + \text{HOH} = \text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH}$ . Az alkalikus és savas eszterhidrolízises reakciók sematikusan az alábbi módon folynak le:



Ebben a reakcióban a lényeg a hidroxil ion, illetve a vízmolekula felvitele. A hidroxil ion kisebb energiát igényel és a fenti reakciót két lépésben így képzelhetjük el:



ahol a *b*) az *a*)-hoz képest gyorsabban folyik le. Ha ez így van, akkor a víz orientációja és távolsága lényegtelené válik és az R radikálisban létrejött változás egyedül az energiatartalomtól ered. A savanyú hidrolízisben az aktiválási energia nagyobb, a vízmolekula még kevésbé aktív ágens és hidrogénion szükséges a kooperációra. Ha a tasztítás nagy a reaktánsok között, akkor a tranzíciós állapot úgy érhető el könnyen, ha a víz nagyobb távolságon van, mint amikor a repulzió gyengébb. Az alkalikus eszterhidrolíziseknél a hidroxil ion nem a vízből jön a reakciócentrum pozitív tagjához, hanem a katalizátorból. A vízmolekula hidrogénionja ezt a már majdnem teljes reakciót csak befejezi és a hátramaradt hidroxil ionja pedig az előbb az enzimfelületen felhasznált hidroxil ion helyébe telepszik. Ez az egész mechanizmus teljesen azonos a láncreakciónál észleltekkkel, csak itt a láncreakció readikálisainak helyébe ionok lépnek. Ezekben a hidrolitikus reakciókban a fentebbi körfolyamatok megindítója egy protonnak vagy hidroxilionnak beépítése, illetve elvonása: egy proton elvonása víz jelenlétében ekvivalens egy hidroxil ion beépítésével. Ez lényegében azonos a sav-bázis katalízissel. Legújabban kimutatták, az eszterkötések hidrolízises reakcióinál, hogy itt nukleofilias töltés eltolódásos reakciókról van szó (58). Legutóbb pedig K o s h l a n d (37, 38) és mások (11, 36, 42, 55) mutatták ki, hogy az ATP enzimatis hasításánál szintén nukleofilias reakció történik: a víz nukleofil hidroxilja ráépül a lehasított foszfát pozitív foszfor atomjára.

Előbb jeleztük, hogy a szüredékben szervesen foszfort csak akkor tudunk kimutatni, amikor az extinkciós maximum kezdett a rövidebb hullámok felé tolni. Ez a foszformennyiség lényegesen több egy adott pillanatban a legnagyobb mértékben hasíthatóvá vált ATP esetében, mint a csökkentebb hasítható ATP-nél. Ez megfelel a viszkoziméteres vizsgálatban kapott görbék lefutásának is. Kísérleteinkben vizsgáltuk az enzim ráhatását az S-, R- és kontrol ATP-re 1—2—4—8—16—18—20 óráig. Azt találtuk, hogy a szervesen foszfor azon idő eltelte után már alig emelkedett, mely idő a viszkoziméteres vizsgálatnál a felső vízszintes szár eléréséig telt el. Ezalatt az idő alatt hasítja le az enzim az ATP-ről a két foszfát-csoportot. Ugyanígy a szüredékből készített spektrogramoknál az extinkció két óráig még valamit emelkedett és ezentúl teljesen változatlan maradt a 20. óráig.

Az ATP-t bontó enzim, pl. az izom aktomiozinjában (B-miozinban) lévő ATP-áz egy igen éles szubsztrát-specifitással rendelkező hidrolízises enzim. Ez azt jelenti, hogy csakis az ATP-ben lévő magasenergiájú foszfáteszter kötést hasítja, és hogy ehhez a hasítási termékek akceptorául csakis egyedül a vizet tudja felhasználni. Nem így a lúgos és savas csoportspecifikus foszfátázok, amelyek a vízen kívül más hidroxiltartalmú vegyületet is tudnak akceptorul használni. Ilyenek a glükóz, glicerin stb. (13, 25, 45, 46). Itt az enzimnek két főfeladatot kell végrehajtani, hogy az ATP foszfáteszterkötését széthasíthassa: *a*) a foszfáteszterkötés hasítás és a vízmolekula hasítása (hidrolízis), *b*) az ATP hasítási termékek ADP, AP, illetve inozin radikálisoknak és a  $PO_4^-$  gyöknek a víz hasítási produktumainak egyikével való összeadása, vagyis transzferáz reakciók létrehozása.

Kísérleteink egyáltalán nem igazolják egyes szerzők (3, 5, 8, 16, 17, 28, 57, 63, 69) azon feltevését, hogy az enzim és szubsztrátum összehozása után az enzim foszforillálása rögtön megtörténik. Ugyanis kísérleteinkben az enzimráhatás után részben 90 másodpercig, részben pedig a hosszabb ideig tartó enzimbehatásokkal az ammonsulfátos kicsapás után nyert foszformeghatározási és az ATP spektrofotó-

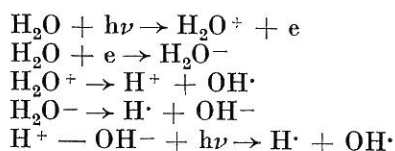
méteres vizsgálati eredmények ezen feltevés ellen szólnak. Viszont igazolni látszanak kísérleti eredményeink azt a feltevést, hogy a transzferálás százalékat nagymértékben befolyásolja az akceptor minemősége és koncentrációja. Valószínűnek tartjuk, hogy ezen hatás kísérleteinkben az ATP-hasítás nagymértékű megnövelésében lényeges és fontos szerepet játszik. Ugyanis szisztémánkban sugárzás hatására a víz hidrogén, illetve hidroxil radikálisokra hasad szét. Ez biztosan homolízises reakció. Az eddigi vizsgálatokból nem tudjuk, hogy az enzim-szubsztrátum komplex képződésben a hidrolízises reakcióknál az enzim által aktivált vízmolekula hasítása homolízises vagy heterolízises reakció eredménye-e? Felvehetjük, hogy nálunk a reakciósebesség nagymértékű megnöveléséhez az is hozzájárul, hogy az enzimnek a komplexusban már nem szükséges vagy legalább is nagyon kismértékben szükséges a vizet aktiválnia és hidrolizálnia, mert a víz hasítási termékeket az enzim készen kapja. Jelentősnek tartjuk ezeket az eredményeket, mert éppen a hidrolízises reakciók egyik eddig még alig ismert hatásához szolgáltatnak adatokat. Másrészt feltűnő, hogy az ammonszulfátos kicsapással milyen könnyen szétválasztható a  $BM + ATP$  komplexből a B-miozin fehérje.

Ahhoz azonban, hogy az ATP hasítás és a hidrolízis végrehajtható legyen, szükséges, hogy az ATP molekula aktivált állapotba jusson. Ez történik az enzim + szubsztátum komplex létrehozásában, az ún. tranzíciós állapotban. Tudjuk, hogy a reakció sebességét az Arrhenius-féle egyenlet fejezi ki:  $k = PZ \cdot e^{-E/RT}$ . Ebben az egyenletben a  $PZ$  faktor az aktiválás entropiája, az  $E$  pedig az aktiválás energiáját jelenti. Az  $e^{-E/RT}$  faktor azt a valószínűséget jelenti, amelynél legalább  $E$  mennyiségű energia gyűlik össze a kötésben egy fluktuáció, illetve egy ütközés alatt, mely képes az  $E$  nagyságú potenciális energia gátját legyőzni.  $E$  jelenti az aktiválási energiát, mely szükséges ahhoz a munkához, amely létrehozza a tranzíciós állapotot, vagyis azt az állapotot, amelyben a molekula konfiguráció a végállapotba való fordulás határán van. Az aktiválási energia felvétele a molekulába feltétlenül és minden körülmények között szükséges ahhoz, hogy a reakció létrejöjjön és az  $E$  aktiválási energia mindig az abszorbeálódott energiát fejezi ki tekintet nélkül arra, hogy a reakcióban az energiaváltozás pozitív, negatív vagy zero. Szabó szerint (56) kvantumkéimiai és magnetokéimiai megfontolások alapján az aktiválási energia az az energiamennyiség, amely szükséges ahhoz, hogy a diamágneses állapotban lévő szubsztátum-molekulát paramágneses állapotba hozza. Ez, mint tudjuk, azt jelenti, hogy a molekula singlet állapotában lévő antiparallel kapcsolt elektronjait a triplet állapot parallel kapcsolású elektron állapotba gerjesztjük. Ez nem más, mint mono-, illetve biradikális állapot létrehozásához szükséges energiamennyiség. Azonban ez az elektron-gerjesztés még nem jelenti a teljes aktiválási állapot létrehozását, mert a triplet állapot létrehozásához szükséges energia még ugyanannál a vegyületnél is aszerint változik, hogy milyen reakcióban vesz részt az illető vegyület. Az energia és entropia faktorok mindig ellentétes értelemben hatnak és kettőjük kompromisszuma dönti el egy reakció aktuális útját. Legújabb szerveskéimiai kutatások alapján tudjuk, hogy a molekula különböző részein való szubsztituálás hogyan befolyásolja az energia és entropia faktorok ezen egymásra hatását.

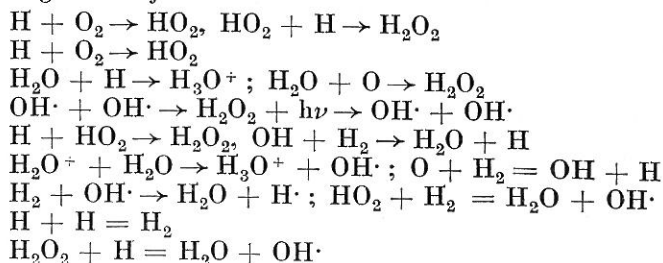
Röviden az alábbiakban szeretnénk rámutatni arra, hogy hogyan gondoljuk a fokozott, illetve csökkent hasíthatóságú ATP létrejöttének hatásmechanizmusát.

Ismeretes, hogy a víz fotolízise már a látható fénykvantumokkal megtörténik. A hasítás eredménye végül is eddig még nem egészen ismert lépcsőkön keresztül hidrogén és hidroxil radikálisok lesznek. Annyit tudunk, hogy a vízmolekula

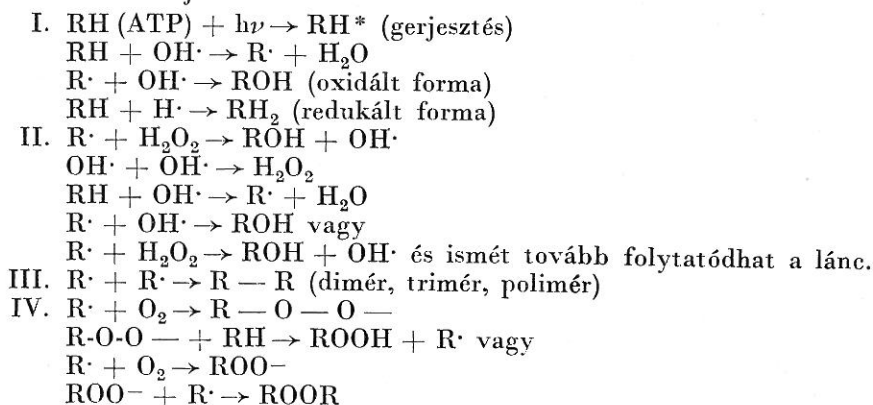
a kvantum abszorbeálódása után létrejött gerjesztett állapotból is hasadhat, vagyis az alábbi ionizációs lépcsőkön keresztül :



Ha oxigén van jelen :



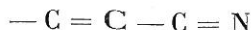
Ha ATP van jelen :



Az ATP az UV-ben 260 millimikronnál erősen abszorbeál. Ez az abszorbeálódott energia kétféleképpen okozhat elváltozást az ATP-ben. Az abszorbeálódott energia hatására a Kasha által megállapított  $n \rightarrow \pi$  tranzícióval (intercrossing system, internal conversion) a pirimidin gyűrű 1 C atomján és 4 nitrogén atomján a kettős kötésben lévő antiparallel kapcsolt  $\pi$  elektronok homolitikusan szétszakadnak: párosítatlan elektronok keletkeznek, biradikális keletkezik, melyek a gyűrűn átkapcsolódnak. Vagyis itt az elnyelt fényenergia hatására a singlet állapotból a molekula triplet állapotba került. Ebben az állapotban, mint ahogy Müller (47, 48) és mások (18, 33) vizsgálataiból tudjuk, a molekula igen gyorsan egyesülhet egy másik ilyen triplet állapotban lévő molekulával és különböző polimerizátumok keletkezhetnek. Vagy pedig, ha oxigén is jelen van, peroxidokká alakulhatnak: vagyis a molekula így stabilizálódik. Ennek a stabilizálódásnak a mértéke akkora, mint az ATP molekulába való másik radikális beépülés foka. Ezt a stabilizálódást előidézhetik a víz fotolíziséből keletkező és ezek kombinálódásából előálló radikálisok. E y r i n g (1, 21), W e i s s (67) és mások (9, 15, 52, 53)



vizsgálataiból tudjuk, hogy nemcsak egy, hanem egymás után több radikális is beépülhet a molekulába. Két radikális kombinálódásakor alig szükséges aktiválási energia. Ez azt jelenti, hogy az így képződött molekula újból könnyen széteshet. A beépülés helye a fenti 1. C atom vagy a 4. nitrogén atom lehet. Hogy a C radikálishoz való beépülés nagyon valószínűtlen, azt az mutatja, hogy ammónia lehasadást nem észleltünk, mely akkor lett volna észlelhető, ha a szénatomhoz pl. egy hidroxil radikális épül be és az ittlévő amidógyök igen könnyen leszakadhat. Hogy ilyen ATP biradikális az UV sugárzó energia közvetlen abszorbeálódásával keletkezhet, bizonyítani látszik a felvett spektrogramok viselkedése. Látjuk, hogy ezeknél az extinkció (az S-ATP-nél) csökkent (18, 33, 47, 48). Természetesen a biradikális ATP kimutatásának biztos bizonyítéka a paramágneses szuszceptibilitás mérése lesz. Müller vizsgálataiból ismerjük, hogy a monomér biradikálisok spektrogramjai ilyen változást mutatnak. Tudjuk továbbá Cavalieri és Bendich (10) purin és pirimidin származékok spektroszkópos vizsgálataiból, hogy ugyanazon abszorpciós maximumnál a pirimidin váz szimmetriáját megváltoztató szubsztitúcióval növekedett az extinkció. Azt találták, hogy az abszorbeálódás az alábbi kromoforban történik:



Azonban azt is megjegyzik, hogy a molekula más részei is hozzájárulnak az abszorpció intenzitásának kialakításához. Ebben a pár példában a lényeges változás mindig a heterogyűrűs vázban előidézett töltés eltolódás volt. Ugyancsak Longuet-Higgins és Coulson (43) kvantummechanikai számításokkal igazolták, hogy a kinolin, izokinolin és a kinoxalin töltéseloszlása kinolinnál már az alapállapotban Y (trans) irányú töltésszeparálódást mutat, mely gerjesztett állapotban még növekszik és ezáltal az abszorpció intenzitása nő. A másik kettőnél pedig az X irányú szeparálódás kifejezettebb már alapállapotban is. Kiss és munkatársai kísérleteikkel igazolták is ezeket a számításokat (39). Azonban hogyan lehetséges, hogy az ATP heterogyűrűs vázában való energiaabszorbeálódás ennek következtében okozott töltés-eltolódás a molekula másik részén lévő speciális kötésben (pl. a magas energiájú cszterkötésben) gyengülést vagy erősödést okoz? Mert ahhoz, hogy az ATP molekula reaktívabbá váljék, a reakciós centrumban lévő kötésben valahogy energiatelítődésnek kell bekövetkezni. Ennek következménye a kötéserősség meggyengülése lesz. Tudjuk, hogy a sok atomú molekulákban az elektronikus nívókban történő energiaabszorbeálódás lényeges változásokat idéz elő a vibrációs nívókban is. Sajnos ezeket a változásokat az UV abszorpciós spektrogramban egyáltalán nem ismerhetjük fel. (Ezeket csak az infravörös, illetve Raman spektrogramok felvételével tudjuk eldönteni. Idevonatkozó kísérleteink most indulnak meg). A molekulában bármely irreguláris lineáris vibráció másik két vibráció szuszpozíciójából áll, amelyek ütközés hiányában nem változtatják amplitudójukat. Amikor a molekula bizonyos folyamatok által, pl. ütközés által vibrációs nívókban gerjesztődik, akkor a már meglévő normális vibrációk általában statisztikus módon gerjesztődnek. Nem egyfajta vibráció lép fel, hanem nagyon soknak a szuperpozíciója. Ezek interferenciajelenségeket mutatnak és az egyes kötések amplitudójának tágulása ismétlődően váltakozik aszerint, hogy a különböző frekvenciáknál a különböző fázisok egymást gyengítik, illetve erősítik. Ilyen értelemben beszélhetünk a molekula egyes kötéseiben az energia apadásáról, illetve felduzzadásáról. Nem látszik lehetetlennek, hogy a molekulában a normális vibrációk különböző kombinációja meghatározza a molekula különböző aktiválási energiáit és különböző transzformációs lehetőségeit (30). Ez a hatás magától



értetődően jelentőséggel bír a reakciósebesség elméletében. Pl. legutóbbi vizsgálatokból tudjuk, hogy a molekulában a hidroxil frekvenciájának változása magával hozza az amplitudó változást. Ez megváltoztatja az oxigén elektronsűrűségét, mely viszont hatással van az aktiválási energia nagyságára és így befolyásolja a reaktivitást (12, 27, 30, 32).

Hogy nyerhet még energiát az ATP molekula a foszfátkötéseiben? Úgy, hogy ide építődnek be a nagy energiájú, a víz fotolíziséből keletkező radikálisok a reakciós centrum valamely atomjának közelébe, illetve magára a centrum atomjára. Ez nyilvánvalóan komoly energiaváltozást idéz elő a centrum kötésében. Ez általánosan ismert módszere a szerveskémiának és alapvető kérdése a kvantumkémiának is. Alapvető kérdés, milyen tényezők befolyásolják egy speciális kötés energiáját, illetve kötés erősségét. Pauling (49, 50), Polányi (51), Ewans (19, 20), Hammett (27) és legújabban Walsh (62, 63, 64) és mások (4, 26) vizsgálatai alapján az alábbi négy tényező befolyásolja egy kötés erősségét: 1. A kötésben szereplő atomok elektronegativitása (50, 62, 64). Minél nagyobb ez, annál nagyobb a kötéserősség, de csak bizonyos határig. 2. A kötés polaritásának nagysága: ha a polaritás növekszik, a kötéserősség csökken. 3. A kötésben szereplő atomok atompályáinak átfedése. Ez minél nagyobb egy bizonyos határig, annál erősebb a kötés. Azonban további átfedésnél a kötés gyengül, az atommagok taszítása folytán. 4. A feltöltött elektronpályák taszítása csökkenti a kötés erősségét. Ezek alapján a fotolízisben termelődött radikálisoknak az alábbi lehetőségei vannak arra, hogy az ATP különböző helyein szubsztituensként való beépüléssel befolyásolják a pirofoszfát lánc eszterkötéseit:

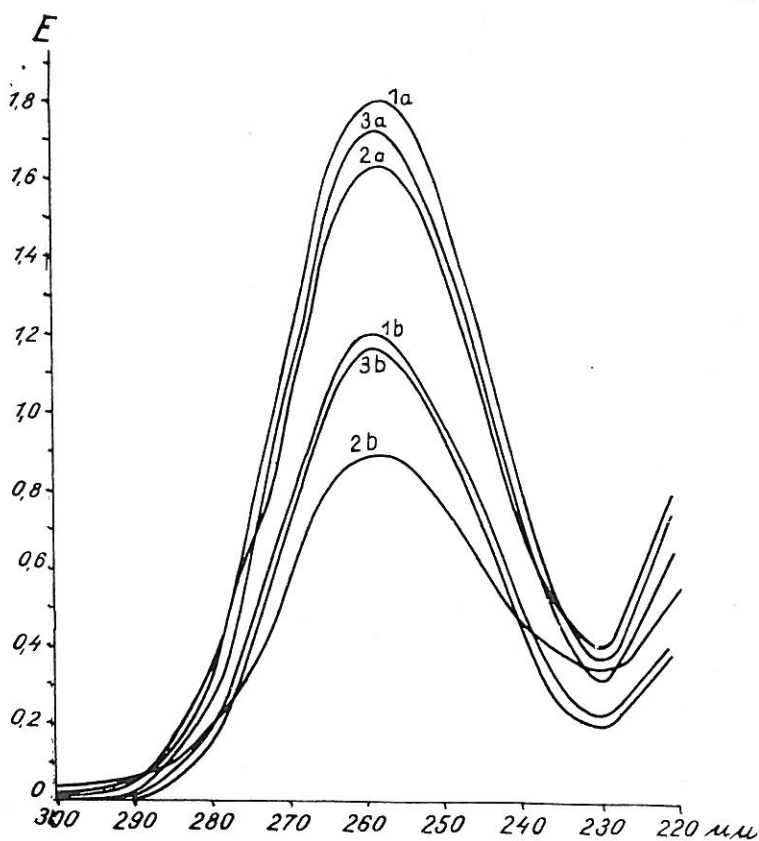
1. A pirofoszfát lánc terminális hidroxilján a hidrogén atomot egy-egy ütköző hidroxil radikális elviszi vízképződés közben és az így képződött ATP radikális peroxidszerűen dimérré egyesül. Ez pedig a fenti Walsh-féle tételek alapján változtathatja elektronegativitását, melynek következtében változik a foszforatom elektronegativitása és polaritása, melynek eredménye a  $P-O-P$  kötés erősségváltozása. Egyesülhet az ilyen ATP radikális egy érintetlen ATP-vel is és ekkor a kettő között *tautomériával* egy hidrogénhíd kötés létesül. Ez szintén a  $P-O-P$  kötésben tautomér vibrációval, az oxigén negatív töltéssűrűségét befolyásolván, okozója lesz az eszterkötéserősség változásának. Ha ugyanez nem a terminális, hanem a pirofoszfátlánc oldalsó hidroxiljaiban történik, akkor már egy másik lényeges és döntő faktor is fellép: a sztérikus gátlás. Az így rákapcsolódó ATP molekula esetleg mind a három hidroxilnál igen erős sztérikus gátlást okoz úgy, hogy a pirofoszfát lánc az enzimmal nem tudja a megfelelő tranzíciós állapotot létrehozni. Ugyanis emiatt nem tud az enzim megfelelő módon orientálódni az ATP reaktív centrumához. Ezáltal növekszik az aktiválás energiája, mert nagy az aktiválás entropiája. Ha a hidrogén radikálisnak, mint erősen elektrofil ágensnek, beépülésével a pirofoszfátláncba a foszforatomról való elektron elszívás miatt — ennek polaritása nő (az eszterkötés erőssége csökken) ez a hatás nem tud érvényre jutni az előbb említett nagyfokú sztérikus gátlás miatt. Két ATP radikális peroxidszerű kapcsolása létrehozásában ismét szerepelhet a Kasch (35, 40) féle  $n \rightarrow \pi^*$  tranzíció. Ezáltal a  $P=O$  kötésben kvantum elnyelődéssel biradikális képződik, mely azután másik ilyen, így képződött biradikálissal peroxidszerűen kapcsolódhat. A P atomba pedig nukleofil részecske: egy hidroxil radikális épül be, növelvén a foszforatomok elektronegativitását és így csökkentvén a  $P-O-P$  kötés egyikét.

2. Meg van a valószínűség arra, hogy nem ilyen dimér formák közben történik a kötésgyöngyítés vagy erősítés. Ez történhet dimérképződés nélküli hidrogén, vagy

hidroxil radikális beépüléssel a pirofoszfát láncba, vagy a foszforatomra, vagy a kettőskötésű oxigénre, esetleg a hidroxil dehidrogenálásával. Ha a  $P=O$  kötésbe az oxigénhez épül be, akkor  $P-OH$  képződik. Ennek eredménye a foszfor pozitivitásának csökkenése. Ugyanis a kettős kötésben az elektronok a  $O$  közelében helyezkedtek el, de most az antiparallel kapcsolódás megszűntével az egyik átment a foszforhoz és így csökkentette ennek pozitivitását, minek eredménye az lett, hogy növekedett az eszterkötés erőssége. De most ide a centrális  $P$  radikálishoz beépülhet egy nukleofil radikális:  $OH\cdot$ , mely magához szívja a  $P$  ezen párosítatlan elektronját és így növeli annak polaritását és ezáltal csökken a  $P-O-P$  egyikében a kötés erőssége. Azonban ide beépülve a hidroxil radikális még sterikus gátlást is kifejt és a pirofoszfát lánc síkjából bizonyos szöggel kifordítja a lánc ezen részét. Ugyancsak növeli a centrális  $P$  atom polaritását, ha a  $P=O$ -ba 2  $OH\cdot$  radikális épül be. Ennek következménye ismét  $P-O-P$  erősségének csökkentése lesz. Ezt mutatják kísérleteink is: a hidroxil radikálisoknak más molekulával való leköttetése és ebbe való beépülése által nem tudtak az ATP molekulába beépülni, minek az lett a következménye, hogy pl. benzoésav, illetve legújabban thiourea jelenlétében sugárzás alatt egyáltalában nem vált fokozottan hasíthatóvá az ATP molekula. Azonban az eddigiek alapján nem tudjuk azt állítani, hogy a fokozott hasíthatóságú ATP létrejöttében a főszerep egyedül az  $OH\cdot$  beépülése. Eddigiek alapján csak annyit mondhatunk, hogy a hidroxil radikálisnak a fokozott hasíthatóságú ATP létrehozásában döntő szerepe lehet. Ezt látszanak bizonyítani a pH függvényében végzett sugárzásos kísérleteink. Az eddigi, különösen a lúgos pH skálán végzett kísérleteinknél azt kaptuk, hogy annál kifejezettebb volt az ATP fokozottan hasíthatóvá válása a sugárzás alatt, mindhárom sugárzásféleségnél, minél lúgosabb volt az ATP oldat. Itt különösen az az érdekes, hogy minél lúgosabb volt az ATP oldat pH-ja, annál hasíthatóbbá vált az ATP már sugárzás nélkül is. Ennek megfelelően itt is fennáll a hasíthatóság és az UV abszorpciós spektrogram extinkció változása között az általános szabályszerű összefüggés. Valóban, mint ahogy ezt a 7. ábrán láthatjuk is, már sugárzás nélkül, pH 8,3 foszfátpufferben bizonyos ideig fényen való állás után az ATP-nek extinkciója a csak vízben (pH 4–5) álló, egyébként ugyanolyan körülmények között tartott ATP extinkciójánál lényegesen kisebbé vált. Ezt a csökkenést a sugárzás még csak fokozta a kontrol ATP extinkciójához képest. Ezek a kísérleti eredmények azt a gondolatot vetik fel, hogy vajjon nemcsak az enzim pH optimumának eltolódása okozza-e az enzimes reakciósebesség megváltozását, hanem a pH eltolódás magán a szubsztrátumon, mint ahogy jelen esetben látjuk, az ATP-n is okoz lényeges molekuláris változásokat, melynek következménye a molekula biológiai aktivitásának megváltozása. Valószínűleg a molekula töltéselosztásának megváltoztatása történik (6, 60, 61). Itt a legfőbb faktor a  $pK$  megváltoztatása a különböző pH-kon. Sok példát tudunk arra, hogy az ionizációs konstans megváltozásával a molekula biológiai aktivitása is nagymértékben megváltozik. *Herington* (29) kimutatta, hogy különböző piridinek, illetve piridinszármazékok moláris extinkciója savas oldatban kétszerese a lúgos oldatbaninak. Mások kimutatták, hogy a timo-nukleinsavak extinkciója is nagymértékben változik a pH-ra (23). *Brown* és *Barbarras* (7), valamint *Flexner*, *Hamett* és *Dingwall* (22) vizsgálataikkal meghatározták ezen piridin, illetve ezek származékai disszociációs konstansát, valamint ennek változását a pH-val. A disszociációs konstans és az abszorpciós spektrogram extinkciójának változása között kvantitatív összefüggést is találtak.

Itt feltehető az UV abszorpciós spektrogramok alapján, hogy az S-ATP kialakulásában, nevezetesen az abszorpciós maximum csökkenésében lényeges

szerepe lehet az ATP molekula koplanaritása megszűnésének a sugárzás hatására bekövetkező valamely okból. Pl. a beépült szubsztituens szterikus gátlása folytán a molekula közös síkjából kifordított egyik molekularész nem tud visszatérni a molekula eredeti síkjába. Valószínűleg a ribóz-pirofoszfát láncnak vagy a pirofoszfát lánc (vagy ennek egyes részei) síkjának és továbbá a purinváz 1 szénatomján lévő amidogökök kifordulása a gyűrű síkjából történhet a sugárzás hatására. Ez jól egyezik spektroszkópos eredményeinkkel, amelyekben az S-ATP-nél mindig az extinkció csökkenését észleltük a molekula reaktivitás fokozásával együtt. Bizo-



7. ábra.

UV sugárzás hatása az ATP abszorpciós spektrumára 8,3 pH-s foszfát pufferben 50  $\gamma$ /ml ATP + UV. 1a: Kontrol pH 8,3 ATP vízben. 2a: UV—ATP vízben. 3a: R—ATP vízben. 1b: Kontrol pH 8,3 ATP. 2b: pH 8,3 UV—ATP. 3b: R—ATP pH 8,3.

nyítékul Müller cikkében közölt ábrára hivatkozunk, ahol azt látjuk, hogy p-dibenzoildifenil még klór szubsztituálással: p, p' dibenzoil 1—2, 6—2', 6'-tetra-kloridfenil származék extinkciója kifejezetten csökken a szubsztituálásra. Ez az észleletünk jól egyezik más szerzők hasonló észleletével a biológiai aktivitás és struktúraváltozás összefüggésében, illetve a reakciósebesség növelésében. Az ATP aminocsoportjának síkja kifordításával a purinvázból, azt hisszük, növelheti az ATP hasíthatóságát, mert az eddigi vizsgálatok megállapítása szerint az ADP-ből való második foszfát lehasítása egyidőben történik az aminocsoportnak a lehasí-





b) A pirofoszfát láncba radikális szubsztituens beépülése a pirofoszfát lánc, illetve annak egyes részei szabad rotációját akadályozza, vagyis a szubsztituens sztérikus gátlása lép fel. Ennek következménye az, hogy az aktiválás entropiája csökken és így az enzimszubsztrát kialakulása a helyes orientáció kialakításával nagymértékben megkönnyül.

c) Tudjuk, hogy a szabad töltéssel rendelkező kémiai ágensek, ionok, illetve radikálisok más molekulával való ütközése, illetve abba való beépülése nemcsak energianyereséget jelent a molekula részére, hanem abban töltéseltolódást is okoz. Valószínűnek tartjuk, hogy az ATP molekulában részben a sugárzó energia közvetlen elnyelődése által, részben pedig a víz radikálisainak beépülésével olyan töltéseltolódás lép fel, amely az enzim-szubsztrát komplexban a tranzíciós állapot kialakulásának kedvez.

d) Az ATP hasítása hidrolízises reakció, vagyis a hasítás után a molekula-fragmentumokba a víz egy-egy konstituense lép be. Láttuk, hogy a hasításhoz feltétlenül szükséges a víz aktiválása, majd széthasítása az enzimfelületen. Rendszerünkben a víz homolízises széthasítása már elég komoly mértékben megvalósult, s így az enzimek már szinte készen állnak az ATP hasítása után keletkező fragmentumokba a hidrogén, illetve hidroxil radikálisok beépítődésére. Véleményünk szerint valószínűen ez is nagymértékben emeli az ATP hasíthatóságának sebességét.

Scholes és Weiss a Nature 1953. 171. 920. oldalon megjelent cikkükben közölt kísérleti eredményeikkel kísérleteinket celjes mértékben alátámasztják. Ők a nuklein-savak vizes oldatban való röntgen sugárzásával a foszfát eszter kötések nagymértékű gyengülését észlelték. Magyarázatul szintén a szabad radikális mechanizmust adják.

Köszönetet mondunk a Magyar Tudományos Akadémiának azért a hathatós anyagi támogatásért, mellyel kutatásainkat lehetővé tette.

### Összefoglalás

1. Az S- és R-ATP a sugárzás után is mutatja az enzim hasíthatóság reverzibilis változását és ennek megfelelően a hasíthatóság és az ultraviola abszorpció extinkciója között általunk megállapított szabályszerű összefüggést is: a hasíthatóság csökkenésével nő az extinkció, a hasíthatóság fokozódásával pedig csökken az extinkció. Ezek a reverzibilis változások időben egyensúly felé tartanak, melynek kialakulását radikális láncmechanizmus szabályozza.

2. Az optikai tulajdonság-változásnak, mely az ATP molekulában a sugárzó energia beépülésével áll elő, nemcsak az adeninvázban bekövetkezett változás az egyedüli hordozója, hanem valószínűen a pirofoszfát láncban, illetve az aminos-csoportban bekövetkezett változás is hozzájárul ehhez. Ezeket a változásokat valószínűen a szubsztituens sztérikus gátlása idézi elő.

3. Az S-, R- és kontrol ATP spektrogramjait vizsgáltuk különböző ideig tartó enzimráhatás után. Az észlelt változás a spektrogramban jellegzetes. Annál kisebb mértékben csökken az enzimráhatás után az extinkció, minél alacsonyabb volt a kiindulási ATP-molekula extinkciós értéke. A nagymértékben fokozottan hasíthatóvá tett S-ATP úgyis alacsony extinkciós értéke alig változott.

4. A hosszabb ideig tartó enzimráhatás után kapott hasítási termékek hip-szokromiát és hiperkromiát mutattak. A hiperkromia extinkciója annál nagyobb, minél nagyobb volt a kiindulási ATP extinkciós értéke.

5. Szerintünk az S—, R—ATP kialakulásában az aktiválási energia csökkenése, illetve növekedése, az aktiválás entropiájának változása, az okozott töltéseltolódás az APT molekulában és végül a sugárzás által okozott víz hidrolízis szerepel.

*Érkezett : 1953. január 12.*



## Irodalom

1. Alder, M. & Eyring, H.: *Nucleonics*, **10**, 54. 1952.
2. Baele, R. N. & Roe, F.: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2302. 1952.
3. Barron, E. S. & Singer, T. P.: *J. Biol. Chem.* **157**, 221. 1945.
4. Braude & Jones: *J. Chem. Soc.* **1948**, 1946.
5. Brenner, M. et al.: *Helv. Chim. Acta*, **34**, 2096. 1951.
6. Broomhead: *Acta Cryst.* **1**, 324. 1948.
7. Brown & Barbaras: *J. Amer. Chem. Soc.* **69**, 1137. 1947.
8. Buchtal, F. et al.: *Nature* **162**, 965. 1948.
9. Butler, J. A. V. & Smith, K. A.: *Nature* **165**, 847. 1950.
10. Cavalieri, L. F. & Bendlich, A.: *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2587. 1950.
11. Clarke, & Koshland, D. E.: *Nature* **171**, 1023. 1952.
12. Coggeshall, N. D.: *J. Amer. Chem. Soc.* **69**, 1620. 1947.
13. Cohn, M.: *J. Biol. Chem.* **180**, 771. 1949.
14. Coulson, C. A. & Jakobs, J.: *Proc. Roy. Soc. A*, **119**, 413. 1939.
15. Dainton, F. S.: *Ann. Reports Progress Chem.* **5**, 1948.
16. Dixon, M.: *Multi-Enzyme Systems*. Cambridge Univ. Press. 1949.
17. Dowmont, J. P. & Fruton, J. S.: *J. Biol. Chem.* **197**, 271. 1952.
18. Dunlop, E. C. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.* **63**, 1167. 1941.
19. Evans, A. G. & Polányi, M.: *Trans. Faraday Soc.* **34**, 11. 1938.
20. Evans, A. G. & Polányi, M.: *Nature* **159**, 608. 1942.
21. Eyring, H. & Polányi, M.: *Z. Phys. Chem. B*, **12**, 279. 1932.
22. Flexser, Hammett & Dingwall: *J. Amer. Chem. Soc.* **57**, 2103. 1935.
23. Garay, K. & Guba, F.: *Agrokémia és Talajtan* **1**, 1. 1951.
24. Greenstein, J. P. & Jenrette, W. V.: *J. Natl. Cancer Inst.* **1**, 77. 1940.
25. Green, H. & Meyerhof, O.: *J. Biol. Chem.* **197**, 347. 1952.
26. Gordy: *J. Chem. Phys.* **14**, 305. 1946.
27. Hammett, L. P.: *Physical Organic Chemistry*. Mc Graw Hill, New York. 1940.
28. Hanes, C. S. et al.: *Bioch. J.* **51**, 25. 1952.
29. Herrington, E. F. G.: *Disc. Faraday Soc.* **26**, 1950.
30. Hinshelwood, C. A.: *The Structure of Physical Chemistry*. Clarendon Press, London. 1951.
31. Holley, A. D. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2771. 1950; **73**, 3172. 1951.
32. Ingraham, L. L. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2297. 1952.
33. Jones, R. N.: *J. Amer. Chem. Soc.* **63**, 1058. 1941.
34. Kalckar, H. M.: *Chem. Rev.* **28**, 71. 1941.
35. Kasha, M.D. & Nauman, J.: *J. Chem. Phys.* **17**, 516. 1949.
36. Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.* **182**, 779. 1950.
37. Koshland, D. E.: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2286. 1952.
38. Koshland, D. E.: *Arch. Bioch.* **39**, 229. 1952.
39. Kiss, A.: *Magyar Kémikusok Lapja* 1949., 1950. 4. sz.
40. Lewis & Kasha, M.: *J. Amer. Chem. Soc.* **66**, 2100. 1944.
41. Limperos, G. & Mosher, W. A.: *Am. J. Roentgenol. Radium Therapy* **63**, 681. 1950.
42. Lipmann, F. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2384. 1952.
43. Longuet-Higgins, H. C. & Coulson, C. A.: *J. Chem. Soc.* 977. 1949.
44. Marsden, R. J. B. et al.: *J. Chem. Soc.* 1383. 1936.
45. Meyerhof, O. & Green, H.: *J. Biol. Chem.* **183**, 377. 1950.
46. Morton, R. K.: *Nature*, **166**, 1092. 1950.
47. Müller, E. et al.: *Ber. deutsch. chem. Ges.* **72**, 2063. 1939; **74**, 807. 1051. 1075. 1941.
48. Müller, E.: *Fortschr. Chem. Forsch.* **1**, 336. 1949.
49. Pauling, L.: *The Nature of Chemical Bonds*. Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y. 1945.
50. Pauling, L.: *J. Amer. Chem. Soc.* **54**, 3570. 1932.
51. Polányi, M. & Wigner, E.: *Z. Phys. Chem.* **139**, A. 439. 1928.
52. Scholes, G. & Weiss, J.: *Nature* **166**, 640. 1104. 1950; **164**, 709. 1949.
53. Scholes, G., Weiss, J. & Stein, G.: *Nature* **164**, 709. 1949.
54. Smith, E. L.: *Proc. Acad. Sci. US.* **35**, 80. 1949.
55. Stein, S. S. & Koshland, D. E.: *Arch. Bioch.* **39**, 230. 1952.
56. Szabó, Z.: *Magyar Kémiai Folyóirat* **54**, 1951.
57. Szentgyörgyi, A.: *Acta Physiol. Scand.* **9**, Suppl. XXV.
58. Swain, J. & Brown, J. F.: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2534. 2538. 1952.
59. Taft, R. W. jr.: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2729. 3120. 1952.
60. Taylor, H. F. W.: *J. Chem. Soc.* 765. 1948.

61. Taylor, H. F. W.: Nature **164**, 750. 1949.
62. Walsh, E.: Trans. Faraday Soc. **43**, 60. 1947.
63. Walsh, E. & Walsh, G.: Nature **161**, 976. 1948.
64. Walsh, E.: J. Chem. Soc. 331. 398. 1948.
65. Weiss, J.: Nature, **153**, 748. 1944.
66. Weiss, J.: Trans. Faraday Soc. **43**, 314. 1947.
67. Weiss, J.: Brit. I. Red. Suppl. **56**, 1. 1947.
68. Wheland, G. W.: The Theory of Resonance. Wiley, N. Y. 1944.
69. White, J. W.: Arch. Bioch. **39**, 238. 1952.

## ДАЛЬНЕЙШИЕ РАДИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С АТФ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

К. Гаран и И. Фегер

Отдел Биохимии Агрохимического Научно-Исследовательского Института,  
Будапешт

### В ы в о д ы

Раствор АТФ-а добавленный к миозину держали при различных условиях для выяснения отношения фермента и субстрата. (В ледяной воде в течение 0, 15, 40, 60 минут на свете и таким же образом с ультрафиолетовым облучением и т. д.) Ферментативное расщепление прекращали добавлением перекристаллизованного сульфата аммония в нужное время. С фильтрата сняли УФ — спектрограмму и определили содержание неорганического фосфора и аммиака. Согласно их экспериментальным данным S-АТФ и R-АТФ обнаруживают обратимое изменение ферментативной расщепляемости и после излучения. В соответствии с этим между расщепляемостью и УФ — поглощением находили определенную связь. С уменьшением расщепляемости экстинкция увеличивается, а с увеличением расщепляемости уменьшается. Эти обратимые изменения идут в направлении равновесия, создание которого регулируется «ценным механизмом» радикалов.

Вследствие фиксации энергии излучения в молекуле АТФ-а возникает изменение оптических свойств. Причиной этого является не только превращение аденинного скелета, но по всей вероятности и изменения пиррофосфатной цепи и аминной группы. Эти изменения вызываются вероятно стерическим торможением субстрата.

После ферментативного действия различной длительности происходит тем менее значительное уменьшение экстинкции, чем меньше была экстинкция начальных молекул АТФ-а. Малая экстинкция превращенного в большой степени расщепляемым S-АТФ-а почти не изменилась.

Продукты расщепления полученные после более длительного ферментативного воздействия обладали гипсохромией и гиперхромией. Экстинкция гиперхромии тем больше, чем выше экстинкция начального АТФ-а.

Возникновение S, и R-АТФ-а объясняют так, что под действием этих лучистых энергий предполагают уменьшение энергии активизации, изменение энтропии активизации, смещение зарядов и гидролиз воды.

Р и с. 1. Изменение расщепляемости АТФ-а в течение УФ излучения. 50  $\mu$ /мл АТФ + УФ (на воздухе). 1: Контроль АТФ. 2: 10 мин. УФ-АТФ. 3: 20 мин. УФ-АТФ. 4: 40 мин. УФ-АТФ. 5: 80 мин. УФ-АТФ. 6: 100 мин. УФ-АТФ.

Р и с. 2а. Изменение расщепляемости — и АТФ-а после УФ излучения (длительность излучения = 1 ч.). 1: 50 0,мл. контроль АТФ, 24 ч. наст. 2: 50  $\mu$ /мл УФ-S АТФ в 0 мин. 3: 500.  $\mu$ /мл УФ-S-АТФ в 0 мин. 4: 50  $\mu$ /мл контроль АТФ в 0 мин. 5: 500  $\mu$ /мл контроль АТФ, 24 ч. наст. 6: 5000  $\mu$ /мл контроль АТФ, 24 часа настаивание.

Р и с. 2б. Влияние УФ на спектр поглощения АТФ-а. Обозначения см. в Рис. 2а.

Р и с. 3а. Кривые ферментативного расщепления АТФ-а настоявшегося при разных концентрациях и температуре. 1: 1 мг/мл/при 36° С. 2: 5 мг/мл при 0° С. 3: 100 мг/мл при 0° С.

Р и с. 3б. Кривые УФ абс. АТФ-а настоявшегося при разных концентрациях и температуре. 1: 1 мг/мл, 36° С. 5: 5 мг/мл 0° С на свете. 100: 100 мг/мл 0° С на свете. Цифры верхнего показателя 0 = максимально 90 сек. Цифры верх. показателя 35—50: 35—50 минутное ферментативное действие.

Рис. 4а. Изменение расщепления 50  $\gamma$ /мл. АТФ-а под влиянием УФ излучения в разных сроках после излучения различное. К.: контроль АТФ в 0 мин. К I.: контроль АТФ в 0 мин. 24 час. наст. на свете. S.: УФ-АТФ в 0 мин. S I.: УФ-АТФ 24 часа настоялось на свете. R.: R-АТФ в 0 мин. R I.: R-АТФ 24 час. наст. на свете. K2.: 96 час. наст. на свете. K3.: 96 час. наст. в темноте.

Рис. 4б. Кривые УФ абс. АТФ-а, под действием УФ излучение после 24 ч. Цифр. верхнего показателя после 35 минутного ферментативного воздействия.

Рис. 4с. и d. УФ спектр АТФ-а в разных сроках после ферментативного действия. I. = 0° С, свет. II. = 0° С темнота. III. = 40° С свет. IV. = 40° С темнота. После ферментативного действия 96 часов и 19 часов наст.

Рис. 5а. Изменение расщепление АТФ-а после УФ изл. (150  $\gamma$ /мл АТФ) К I.: контроль АТФ в 0 мин. К II.: Контроль АТФ 48 час. настаивание на свете. S I.: S-АТФ в 0 мин. S II.: S-АТФ 48 часов настаивание на свете. R I.: R-АТФ в 0 мин. R II.: R-АТФ 84 час. настаивание на свете.

Рис. 5б. Спектрограммы K-S-R-АТФ-а после ферментативного действия различной длительности. Обозначения: К, S, R: спектрограмм АТФ-а без ферментативного действия. K0, S0, R0: максимально 90 сек. ферментативного действия. K40, S40, R 40: 40 мин. и K60, S60, R60: 60 минут ферментативного действия.

Рис. 6а. Изменение расщепления — и 100  $\gamma$ /мл. АТФ-а при УФ излучения. Обозначения: I. = 0 мин. II. = 24 часа наст.

Рис. 6б. УФ абс. спектрограммы после ферментативного действия разной длительности. К-, R-, S-, без ферментативного действия. После 15 и 60 минут ферментативного действия.

Рис. 7. Изменение расщепления АТФ-а, фосфатный буфер (pH = 8,3) и УФ изл. (30 мин.) 50  $\gamma$ /мл. АТФ. 1а.: контроль АТФ в воде. 2а.: УФ-АТФ в воде. 3а.: R-АТФ в воде. 1б.: контроль АТФ, pH 8,3. 2б.: УФ-АТФ pH 8,3. 3б.: R-АТФ pH 8,3.

## Further Radiochemical Investigations of Adenosine Triphosphate in Aqueous Solution

K. GARAY and I. G. FEHÉR

Section for Biochemistry, Agrochemical Research Institute, Budapest

### Summary

With the aim to clear up the correlation enzyme + substrate an aqueous solution of ATP which has been added to B myosin was kept under diverse conditions (in ice water for 0,15, 40 and 60 minutes in light or irradiated by ultraviolet rays, etc.). The enzymatic splitting was stopped at the period needed by the addition of recrystallised ammonium sulphate. Then an ultraviolet spectrum was taken of the filtrate and in separate samples the quantity of inorganic phosphorus and ammonia was determined.

According to the data of investigations S-ATP and R-ATP showed the reversible change of enzymatic splittability even subsequently to irradiation. Correspondingly, a definite correlation was found between splittability and ultraviolet absorption: extinction increased with decreasing splittability and diminished with its increase. These reversible changes tend to an equilibrium the formation of which is controlled by a chain mechanism of radicals.

In the ATP molecule the optical properties alter, owing to accepting radiation energy. This alteration is caused not only by changes in the adenine skeleton but probably also by changes in the pyrophosphate chain and the amino group, respectively, produced by the steric hindrance of the substituent.

After enzymatic action for diverse periods the decrease of extinction was the greater the higher was the extinction value of the starting ATP molecule. The originally low extinction value of S-ATP which has been made greatly splittable showed almost no changes.

Splitting values obtained after an enzymatic action for longer periods showed hypsochromy and hyperchromy. The extinction of hyperchromy was the higher the higher extinction values were observed in the starting ATP.

The formation of S-ATP and R-ATP, respectively, is explained by presuming that under the effect of radiation energy the activation energy decreases, the entropy of activation changes, the electric charge is shifted and hydrolysis of water occurs.



*Fig. 1.* Changes in the splittability of ATP during irradiation by ultrasonic rays, (US) 50  $\gamma$ /ml ATP+US (in air). 1: Control ATP. 2: 10 minutes US-ATP. 3: 20 minutes US-ATP. 4: 40 minutes US-ATP. 5: 80 minutes US-ATP. 6: 100 minutes US-ATP.

*Fig. 2. a.* Changes in the splittability of ATP under the effect of ultrasonic rays (irradiation for 1 hour). 1: 50  $\gamma$ /ml control ATP, standing for 24 hours. 2: 50  $\gamma$ /ml US-S-ATP, at 0 minute. 3: 500  $\gamma$ /ml US-S-ATP, at 0 minute. 4: 50  $\gamma$ /ml control ATP, at 0 minute. 5: 500  $\gamma$ /ml control ATP, standing for 24 hours. 6: 5000  $\gamma$ /ml control ATP, standing for 24 hours.

*Fig. 2. b.* Effect of US on the absorption spectrum of ATP. Legend as in Fig. 2. a.

*Fig. 3. a.* Enzymatic splitting curves of ATP of varying concentration allowed to stand at diverse temperatures in varying concentrations. 1: 1 mg/ml at 36° C. 2: 5 mg/ml at 0° C. 3: 100 mg/ml at 0° C.

*Fig. 3. b.* Ultraviolet absorption curves of ATP of varying concentration allowed to stand at diverse temperatures. 1: 1 mg/ml at 36° C. 5: 5 mg/ml at 0° C in light. 100: 100 mg/ml at 0° C in light. Values denoted by upper °C indexes indicate ATP samples treated not more than 90 seconds, those with upper indexes 35—50 denote ATP samples treated 35 to 50 minutes with enzyme.

*Fig. 4. a.* Changes in the splittability of ATP (50  $\gamma$ /ml) under the effect of ultraviolet irradiation at diverse periods at 0° C subsequent to treatment. K: control ATP at 0 minute. K 1: control ATP after standing in light for 24 hours. S: UV-treated ATP at 0 minute. S 1: UV-treated ATP after standing in light for 24 hours. R: R-ATP at 0 minute. R 1: R-ATP, standing for 24 hours in light. K 2: standing for 96 hours in light. K 3: standing for 96 hours in darkness.

*Fig. 4. b.* Ultraviolet absorption curves of ATP under the effect of UV irradiation, 24 hours after treatment. The upper indexes denote values obtained after 35 minutes of enzymic treatment.

*Fig. 4. c. and 4. d.* Ultraviolet spectrum of ATP at diverse periods, subsequently to treatment with enzyme. I: 0° C, in light. II: 0° C, in darkness. III: 40° C, in light. IV: 40° C, in darkness. Observed 96 and 192 hours, respectively, after enzymatic treatment.

*Fig. 5. a.* Changes in the splittability of ATP under ultraviolet irradiation at 0° C, 150  $\gamma$ /ml ATP. K I: control ATP, at 0 minute. K II: control ATP, standing 48 hours in light. S I: S-ATP at 0 minute. S II: S-ATP, standing 48 hours in light. R I: R-ATP at 0 minute. R II: R-ATP standing 48 hours in light.

*Fig. 5. b.* Spectrograms of K-S-R-ATP after enzymatic treatments for varying periods. K, S, R denote spectrograms of ATP without enzymatic treatment. K0, S0, R0, spectrograms of ATP after treatment with enzyme for not more than 90 seconds. K40, S40, R40, same after enzyme treatment for 40 minutes. K60, S60, R60 same after enzyme treatment for 60 minutes.

*Fig. 6. a.* Changes in splittability of ATP under ultraviolet irradiation, 100  $\gamma$ /ml ATP. I denotes samples at 0 minute, II those after standing for 24 hours.

*Fig. 6. b.* Ultraviolet absorption spectrograms after enzymatic treatment for diverse periods. K-, R-, S-, without enzymatic treatment, and enzymatic treatment for 15 and 60 minutes.

*Fig. 7.* Effect of ultraviolet irradiation on the absorption spectrum of ATP in a 8,3 pH phosphate buffer, 50  $\gamma$ /ml ATP + UV. 1a: Control ATP in water, pH 8,3. 2a: UV-ATP in water, pH 8,3. 3a: R-ATP in water. 1b: Control ATP, pH 8,3. 2b: UV-ATP, pH 8,3. 3b: R-ATP, pH 8,3.

## Weitere radiochemische Untersuchungen von Adenosintri-phosphat in wässriger Lösung

K. GARAY und I. G. FEHÉR

Biochemische Abteilung des Agrochemischen Forschungsinstituts, Budapest

### Zusammenfassung

Eine mit B Myosin vermischte ATP-Lösung wurde unter verschiedenen Bedingungen gehalten (in eiskaltem Wasser im Licht 0,15, 40, 60 Minuten lang, sowie in ultravioletter Bestrahlung usw.), um das Verhältnis Enzym-Substrat zu klären. Die Enzymspaltung wurde im gewünschten Zeitpunkte durch Zugabe von umkristallisiertem Ammonsulfat zum Stillstand gebracht. Ein ultraviolettes Spektrogramm des Filtrates wurde aufgenommen und der Gehalt an anorganischem Phosphor und Ammoniak ermittelt.

Wie aus den Untersuchungsergebnissen ersichtlich, zeigen S-ATP und R-ATP eine reversible Veränderung der Spaltbarkeit durch Enzyme eben nach der Bestrahlung. Demgemäss wurde zwischen Spaltbarkeit und ultravioletter Absorption ein bestimmter Zusammenhang gefunden; indem die Extinktion mit abnehmender Spaltbarkeit zunimmt und mit der Verstärkung der Spaltbarkeit sich vermindert. Alle diese reversiblen Veränderungen gehen auf ein Gleichgewicht zu, dessen Ausbildung durch einen Kettenmechanismus der Radikale reguliert wird.

Im ATP-Molekül entsteht eine Veränderung in den optischen Eigenschaften infolge des Einbaues von Bestrahlungsenergie. Diese Veränderung wird nicht nur durch einen Umbau des Adeninskeletts, sondern wahrscheinlich auch durch Veränderungen in der Pyrophosphatkette, bzw. in der Aminogruppe verursacht, hervorgerufen durch die sterische Hinderung des Substituenten.

Nach verschieden langer Enzymbehandlung verminderte sich die Extinktion in je kleinerem Masse, desto kleiner der Extinktionswert des ursprünglichen ATP-Moleküls war. Die schon ohnehin kleine Extinktion des in grossem Masse spaltbar verwandelten S-ATP zeigte beinahe keine Veränderungen.

Die nach einer längeren Enzymbehandlung erhaltenen Spaltungsprodukte zeigten eine Hypsochromie und Hyperchromie. Die Extinktion der Hyperchromie war je grösser, desto grösser die Extinktion des Ausgangs-ATP war.

Verfasser erklären die Bildung von S-ATP, bzw. R-ATP durch die Annahme, dass unter dem Einfluss dieser Bestrahlungsenergien die Aktivierungsenergie sich vermindert, die Aktivierungsentropie sich ändert, die Ladung verschoben wird und eine Hydrolyse des Wassers entsteht.

*Abb. 1.* Veränderung der Spaltbarkeit des ATP während einer ultrasonischen Bestrahlung. 50  $\gamma$ /ml ATP + US (in Luft). 1: Kontroll-ATP. 2: 10 Minuten US-ATP. 3: 20 Minuten US-ATP. 4: 40 Minuten US-ATP. 5: 80 Minuten US-ATP. 6: 100 Minuten US-ATP.

*Abb. 2/a.* Veränderung der Spaltbarkeit des ATP unter dem Einfluss einer ultrasonischen Bestrahlung (1 Stunde lang). 1: 50  $\gamma$ /ml Kontroll-ATP, nach 24 Stunden Stehenlassen. 2: 50  $\gamma$ /ml US-ATP, in der 0. Minute. 3: 500  $\gamma$ /ml US-ATP, in der 0. Minute. 4: 50  $\gamma$ /ml Kontroll-ATP, in der 0. Minute. 5: 500  $\gamma$ /ml Kontroll-ATP, nach 24 Stunden Stehenlassen. 6: 5000  $\gamma$ /ml Kontroll-ATP, nach 24 Stunden Stehenlassen.

*Abb. 2/b.* Einfluss einer ultrasonischen Bestrahlung auf das Absorptionsspektrum von ATP. Bezeichnungen s. Abb. 2/a.

*Abb. 3/a.* Enzymspaltungskurven einer ATP-Lösung, die bei verschiedener Konzentration und Temperatur stehen gelassen wurde. 1: 1 mg/ml, bei 36° C. 2: 1 mg/ml, bei 0°. 3: 100 mg/ml, bei 0° C.

*Abb. 3/b.* Ultraviolette Absorptionskurven einer ATP-Lösung, die bei verschiedener Konzentration und Temperatur stehen gelassen wurde. 1: 1 mg/ml, bei 36° C. 5: 5 mg/ml, bei 0° im Sonnenlicht. 100: 100 mg/ml, bei 0°, im Sonnenlicht. Die mit einem 0-Index bezeichneten Zahlenwerte zeigen ATP-Lösungen, welche höchstens 90 Sekunden lang, die mit 35—50 bezeichneten 35—50 Minuten lang mit Enzym behandelt wurden.

*Abb. 4/a.* Veränderung der Spaltbarkeit von ATP (50  $\gamma$ /ml) unter dem Einfluss einer ultravioletten Bestrahlung, bei verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. K: Kontroll-ATP, in der 0 Minute. K 1: Kontroll-ATP, nach 24 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht. S: UV-ATP, in der 0 Minute. S 1: UV-ATP, nach 24 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht. R: R-ATP, in der 0 Minute. R 1: R-ATP, nach 24 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht. K 2: nach 96 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht. K 3: nach 96 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht.

*Abb. 4/b.* Ultraviolette Absorptionskurven von ATP unter dem Einfluss einer ultravioletten Bestrahlung, 24 Stunden nach der Bestrahlung. Die mit oberen Indexzahlen bezeichneten Werte zeigen die nach einer 35 Minuten langen Enzymbehandlung erhaltenen Daten.

*Abb. 4/c und d.* Ultraviolettes Spektrum von ATP bei verschiedenen Zeitpunkten nach der Enzymbehandlung. I: bei 0° im Sonnenlicht. II: 0° in Dunkelheit. III: bei 40° C im Sonnenlicht. IV: bei 40° C in Dunkelheit. Beobachtet 96 bzw. 192 Stunden nach Enzymbehandlung.

*Abb. 5/a.* Veränderung der Spaltbarkeit von ATP unter dem Einfluss einer ultravioletten Bestrahlung, ATP-Lösung von 150  $\gamma$ /ml. K I: Kontroll-ATP, in der 0 Minute. K II: Kontroll-ATP, nach 48 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht. S I: S-ATP, in der 0 Minute. S II: S-ATP, nach 48 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht. R I: R-ATP, in der 0 Minute. R II: R-ATP, nach 48 Stunden Stehenlassen im Sonnenlicht.

*Abb. 5/b.* Spektrogramme von K—S—R-ATP nach verschieden langer Enzymbehandlung. Bezeichnungen: K, S, R Spektrogramme von ATP nach einer höchstens 90 Sekunden langen Enzymbehandlung. K<sub>40</sub>, S<sub>40</sub>, R<sub>40</sub> Spektrogramme nach 40 Minuten langer Enzymbehandlung. K<sub>60</sub>, S<sub>60</sub>, R<sub>60</sub> Spektrogramme nach 60 Minuten langer Enzymbehandlung.

*Abb. 6/a.* Veränderung der Spaltbarkeit von ATP (eine Lösung von 100  $\gamma$ /ml) unter dem Einfluss einer ultravioletten Bestrahlung. Bezeichnungen: I: in der 0 Minute. II: nach 24 Stunden Stehenlassen.

*Abb. 6/b.* Ultraviolette Absorptionsspektrogramme nach Enzymbehandlungen verschiedener Länge. K, R, S: ohne Enzymbehandlung, bzw. nach einer 15 und 60 Minuten lange Behandlung.

*Abb. 7.* Wirkung einer ultravioletten Bestrahlung auf das Absorptionsspektrum von ATP in einem Phosphatpuffer von 8,3 pH, 50  $\gamma$ /ml ATP + UV. 1a: Kontroll-ATP im Wasser, pH 8,3. 2a: UV-ATP im Wasser. 3a: R-ATP im Wasser. 1b: Kontroll-ATP, pH 8,3. 2b: UV-ATP, pH 8,3. 3b: R-ATP, pH 8,3.